

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-179639

(43)Date of publication of application : 06.08.1987

(51)Int.Cl.

G01N 21/75
G01N 35/00

(21)Application number : 61-021060

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 31.01.1986

(72)Inventor : MATSUMOTO JUNICHI
YAMAMOTO HIDEKI

(54) MULTI-ITEM BIOCHEMICAL ANALYSIS

(57)Abstract:

PURPOSE: To remove errors due to turbid components without use of a number of blank channels or a reference liquid for turbidity, by a method wherein a sample containing suspension material is divided by every item, is mixed with a reaction liquid to measure absorbance and correction of a blank absorbance determined by a specified method is applied.

CONSTITUTION: A sample containing suspension material is divided by every item and mixed with a reaction agent for item-wise measurement to make a measuring liquid. Absorbance with a specified wavelength of each measuring liquid is measured. On the other hand, the sample is mixed with a blank reaction reagent excluding reaction components from a reaction reagent to prepare a sample blank liquid. The absorbance of the blank liquid is measured at least about two kinds of wavelengths to obtain a wavelength-absorbance regression function. A blank absorbance at the measuring wavelength is calculated about respective items from the regression function to correct absorbance of each measuring liquid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-179639

⑤ Int.Cl.⁴

G 01 N 21/75
35/00

識別記号

庁内整理番号

8305-2G
8506-2G

⑬ 公開 昭和62年(1987)8月6日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 多項目生化学分析方法

⑮ 特 願 昭61-21060

⑯ 出 願 昭61(1986)1月31日

⑰ 発 明 者 松 本 順 一 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑱ 発 明 者 山 本 英 毅 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

明 細 書

1. 発明の名称

多項目生化学分析方法

2. 特許請求の範囲

1. 懸濁物質が混在する検体の多項目生化学分析を行なうに際し、各項目毎に分割された検体に各々の項目測定用の反応試薬を混合して測定液とし、これら各測定液の所定波長における吸光度を各々計測しこれらの各吸光度に基づいて複数項目の定量を行なうことからなり、

さらに検体にブランク反応用試薬を混合した一つの検体ブランク液を調製し、このブランク液の吸光度を少なくとも二種の波長により計測して波長-吸光度の回帰関数を求め、この回帰関数から上記各項目についての計測波長におけるブランク吸光度を算出し、この各ブランク吸光度により上記各測定液の吸光度を補正することを特徴とする多項目生化学分析方法。

2. 懸濁物質が混在する検体が、乳び血清である特許請求の範囲第1項記載の分析法。

3. 発明の詳細な説明

(イ) 産業上の利用分野

この発明は、多項目生化学分析方法に関する。さらに詳しくは、乳び血清等の懸濁物質が混在した検体の測定に有用な多項目生化学分析方法に関する。

(ロ) 従来の技術

従来、血清、血漿、尿等の生化学検体中の多項目生化学分析に、比色分析や比濁分析を用いた方法が行なわれており、通常、各項目毎に分割された検体に所定の反応試薬を混合して測定液とし、これら各測定液の所定波長における吸光度をエンドポイント法により各々計測して各々標準検体を比色あるいは比濁して求めた濃度算出係数を乗ずることにより各項目の定量が行なわれている。そしてこの際の分析項目としては、例えばTP、ALB、T-CHO、PL、TG、T-BiL、D-BiL、GLV、Ca、IP等が挙げられ、また吸光度計測波長としては通常340～750nmの範囲のものが適用されている。

(ハ) 発明が解決しようとする問題点

しかしながら、検体の中には、カイロミクロンやリボタンバクが著しく多いために濁っているいわゆる乳び血清がある。ある項目をエンドポイント法で測定する場合、反応によって変化する吸光度の他にかかる乳び血清では、濁りにより光の散乱が生じて見かけの吸光度が増加し、分析結果に正の影響を与えるという不都合が生じる。

これを補正するために、各項目毎に、検体とブランク反応用試薬（各反応試薬から反応成分を除いたもの）とを混合した検体ブランク液を調製し、上記測定液と同一の測定条件で吸光度を計測し、これらの検体ブランク液の吸光度を上記測定液の吸光度から各項目毎に減算する方法（検体ブランク法）や、実際の検体のブランク液を、定められた2波長で計測して得られる吸光度差を、予め濁りの基準液（ポリスチレン粉末懸濁液）を上記2波長で計測して得られた吸光度を単位濁度あたりの吸光度に換算した値で除し、その値に基準液について基めておいた他の波長（反応液の吸光度計

測波長）への換算定数を乗じて、それを当該波長での検体自身の濁りとして、反応液の吸光度から減じて補正する方法（特開昭54-63785号公報）などが知られている。

しかし、前者の方法では、自動分析装置においてはブランク液計測用のチャンネルを多数必要とする問題点がある。一方、後者の方法では、濁りの基準液の入手が容易ではなく、濁り成分の粒径が異なればスペクトルが異なるので、単一の基準液を乳び血清などの検体の濁りを総括した基準液とするのには無理がある。すなわち、乳び血清の主たる濁り成分であるカイロミクロンの粒径は約0.5 μ m、リボタンバクのうちプレー β -リボタンバクは約0.08 μ m、 β -リボタンバクは約0.035 μ m、 α -リボタンバクは約0.015 μ mと各々粒径が相異しており、検体の濁りが何に由来しているものかによりスペクトルの形が異なるのでポリエチレン粉末を単一の基準物質とする前記基準液を用いる補正方法では正確な補正が困難であった。

この発明は、かかる問題点を解消すべくなされ

たものであり、ことに、1検体に対してそれぞれを異なった波長で計測するためのブランクチャンネルを多数必要とせず、しかも上記濁りの基準液などを用いることなく、濁り成分による誤差を可能な限り正確に除去できる多項目生化学分析方法を提供しようとするものである。

(ニ) 問題点を解決するための手段

かくしてこの発明によれば、懸濁物質を混在する検体の多項目生化学分析を行なうに際し、各項目毎に分割された検体に各々の項目測定用の反応試薬を混合して測定液とし、これら各測定液の所定波長における吸光度を各々計測しこれらの各吸光度に基づいて複数項目の定量を行なうことから

さらに検体にブランク反応用試薬を混合した一つの検体ブランク液を調製し、このブランク液の吸光度を少なくとも二種の波長により計測して波長-吸光度の回帰関数を求め、この回帰関数から上記各項目についての計測波長におけるブランク吸光度を算出し、この各ブランク吸光度により上

記各測定液の吸光度を補正することを特徴とする多項目生化学分析方法が提供される。

この発明の最も特徴とする点は、乳び血清のごとき懸濁物質を含有する検体を対象として多項目分析を行なう際に、一つの検体について単一の検体ブランク液を用いる点にあり、かつかかる単一の検体ブランク液について、二種以上の波長における吸光度を計測して検体ブランク液についての波長-吸光度回帰関数を求め、これに基づいて各項目について計測される波長での吸光度を算出し、これを反応液の吸光度から差引くことにより乳びを補正する点および濁りの基準液を必要としない点にある。

この発明の方法に用いる反応試薬は、意図する分析項目に対応する当該分野で公知の種々の反応試薬が用いられる。これらの反応試薬の中には、例えば、検体中の抗体に抗原抗体反応させて比濁分析するための抗血清試薬等も含まれる。

この発明に用いるブランク反応用試薬は、上記反応試薬から反応成分を除いたものが吸収をもた

ないものであれば、いずれの反応試薬に対応するものであってもよく、例えば、反応試薬の溶媒となる緩衝液、生理食塩水、水などが適用できる。かかるブランク反応用試薬を検体と混合した検体ブランク液は一検体につき一つ調製しておけばよい。

上記検体ブランク液の吸光度測定は、少なくとも二種の波長により行なわれる。通常、より正確な回帰関数を得るために、計測波長を増すことが適している。通常、各項目の計測は340～750nmの範囲内で行なわれるため、この範囲における波長-吸光度回帰関数が得られるべく、この範囲内の2～4種の波長を適宜分散して選択するのが好ましい。ただし、意図する各項目の計測波長の範囲が狭い場合には、これら両端付近の少なくとも二種の波長に基づいて回帰関数を求めればよい。回帰関数の求め方について以下説明する。

まず計測波長 λ (nm)をx軸に、吸光度 A (Abs)をy軸にとると、濁りのスペクトルは例えば第1図のようになる。濁った試料を同時にn種

の波長 $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n$ で計測した場合の吸光度を各々 A_1, A_2, \dots, A_n とすると、波長と吸光度の関係は $A = a \lambda^b$ (a, b は定数)の式に近似できる。ここで定数 a は濁りの程度、 b は濁り成分の平均粒径で決まる。従って波長と吸光の組み合わせ $(\lambda, A) = (\lambda_1, A_1), (\lambda_2, A_2), \dots, (\lambda_n, A_n)$ でべき乗回帰(この場合最小二乗法)すれば、定数 a, b の値が決定できるので、これに基づいて任意の波長におけるブランク液の吸光度を推定することができる。

また、前述のごとく乳び血清中の濁り成分はカイロミクロンとリポタンパクの2種類に大別されるため、より厳格な回帰を行なうには、波長と吸光度の関係を $A = a_1 \lambda^{b_1} + a_2 \lambda^{b_2}$ で表わし、 a_1, b_1 はカイロミクロンに由来、 a_2, b_2 はリポタンパクに由来する定数として、異なる少なくとも4つの波長から a_1, a_2, b_1, b_2 を求めて波長と吸光度の回帰関数とするのが適している。しかしながら、実用分析においては、前述のごとき平均粒径からのべき乗回帰で十分に意

図する補正ができることが見出されている。

なお、各測定反応液と検体ブランク液における検体の混合比が異なる場合には、容積補正を行えばよく、必ずしもこれらの最終反応液中の検体濃度が一致してなくてもよい。ブランク液量 V_B (μ l)、その中の検体量 v_B (μ l)、測定液量 V_A (μ l)、その中の検体量 v_A (μ l)とし、検体ブランク液の波長 λ における上記回帰関数による算出吸光度を A_B 、測定反応液の波長 λ における吸光度を A_A とすると、測定反応液の波長 λ における実質的な反応による吸光度 A_C は、

$$A_C = A_A - (V_B \cdot v_A / V_A \cdot v_B) \cdot A_B$$
で求めることができる。

この発明の方法は、通常、多項目に対応する複数の分析ラインを備えた多項目自動分析装置を用い、さらに、ブランク反応用試薬を検体に添加する分注手段と、この検体ブランク液の吸光度を少なくとも2種の波長で各々計測する多波長光度計を備えたブランクラインを付設して行なうのが好ましい。さらに、上記ブランクラインで計測され

た2種以上の吸光度に基づいて懸濁物質が混在する各々の検体による検体ブランク液について波長-吸光度の回帰関数を求めて任意の測定項目・波長における検体ブランク吸光度を算出してかつ必要に応じて前記容積補正を行ない、これを反応液の吸光度から差引く演算を行なう演算部をプログラム制御されたマイクロプロセッサで構成して自動化するのが好ましい。かかる多項目生化学分析装置の構成を第2図に示した。第2図において、(1)(2)…は複数の分析ライン、(3)は単一のブランクライン、(4)(4)…は測定液、(4A)は検体ブランク液、(5)(5)(5)…は検体分注器、(6)(7)は反応試薬、(8)はブランク反応用試薬、(9)(9)は各々の項目測定用の波長固定光学計測系、(11)は多波長測光可能な光学計測系で(11A)は分光器、(12)は光電検出器、(13)は上記補正演算部をそれぞれ示すものである。

(ホ) 作用

この発明の方法によれば、測定液中に存在する検体中の懸濁物質の散乱等に基づく吸光度の正の誤差が補正されることとなる。

(ハ) 実施例

3種類の実験体（乳び血清）50 μ l に対して、各々ブランク反応用試薬として生理食塩水を 2.5 ml を加えてブランク液を調製し、340nm と 700nm での吸光度を測定し、最小二乗法によって波長と吸光度の関係 $A = a \lambda^b$ における定数 a 及び b を算出した。

かかる回帰関数に基づいて、このブランク液の 400, 450, 500, 550, 600 及び 650nm における吸光度を算出した。一方、実際に 340~700nm の間で走査して得られたスペクトルは第 3 図に示すごとくであった。

上記、回帰関数に基づいた 400~650nm の算出吸光度と、実測値（第 3 図）による 400~650nm の吸光度とを比較した結果を第 1 表に示す。

（以下余白、次頁に続く）

第 1 表

検体 No.	波長 (nm)	400	450	500	550	600	650	備考
1	実測値	211	152	118	86	67	54	$a=2.09 \times 10^9$
	計算値	208	148	111	86	68	55	$b=2.69$
2	実測値	57	47	38	21	16	13	$a=6.01 \times 10^9$
	計算値	55	39	28	21	16	13	$b=8.06$
8	実測値	82	56	36	22	16	12	$a=8.04 \times 10^{11}$
	計算値	78	49	33	23	16	12	$b=8.35$

（単位 mAbs）

このように、前記回帰関数による値と、実際の吸光度とはほぼ一致しており、異なる波長におけるブランク液の吸光度を実際に測定することなく、正確に推定することが可能であることが判る。従って、上記回帰関数を用いることにより多項目生化学分析における各項目について濁りの補正を簡便に行なうことができることが判明した。

(ト) 発明の効果

この発明の方法によれば、従来のごとき特殊な濁りの基準液を用いることなく、しかも多数のブランクチャンネルを必要とせず、エンドポイント法による多項目生化学分析を濁りによる誤差を生じることなく行なうことができる。従って、ことに大量の検体を扱う生化学自動分析方法や装置に極めて有用な方法である。

4. 図面の簡単な説明

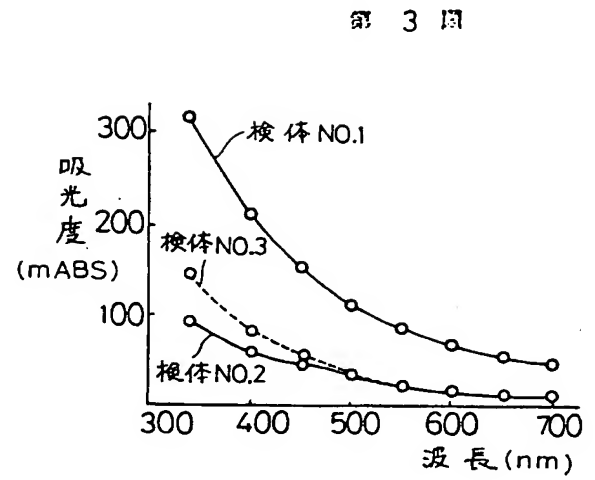
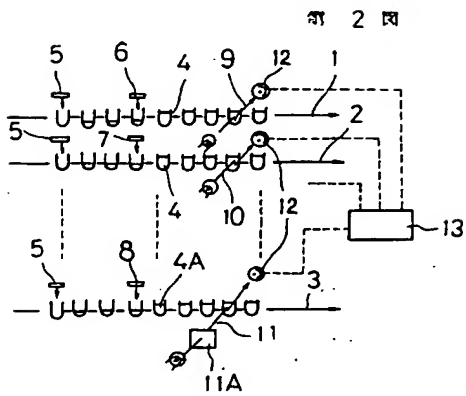
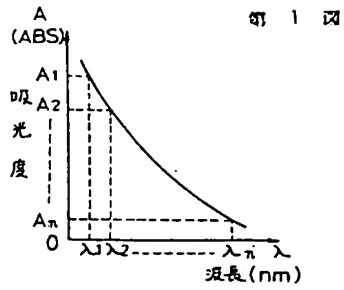
第 1 図は、この発明の方法における波長—吸光度回帰関数の決定についての説明図、第 2 図は、この発明の方法を実施する装置を例示する構成説明図、第 3 図は実施例における波長と吸光度との

関係を示すグラフ図である。

- (4) ……測定液、(4A) ……検体ブランク液、
 (6)(7) ……反応試薬、(8) ……ブランク反応用試薬、
 (11) ……多波長測光可能な光学計測系、
 (13) ……補正演算部。

代理人 弁理士 野 河 信 太





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.